

Protocolo para Proyecto de Investigación 2014

Titulo del proyecto

Expresión diferencial de genes para tolerancia al estrés salino en Costilla de Vaca (*Atriplex Canescens*).
(Differential expresión of genes for tolerance to salt stress in *Atriplex Canescens*).

Introducción

En la actualidad México se encuentra en un gran riesgo de perder la oportunidad de participar en la revolución biotecnológica que se encuentra transformando totalmente los métodos de producción agrícola en los países desarrollados y que comienza a extenderse a países con economías menos desarrolladas. Los elementos esenciales para participar en esta revolución son la ingeniería genética y la genómica funcional. En el mundo se está trabajando en la identificación sistemática del mayor número de genes, como los de resistencia a enfermedades, resistencia a sequía, heladas y condiciones tales como salinidad o acidez (Bolívar F, 2001).

El estrés salino se ha convertido en un peligro ambiental perjudicial para la productividad agrícola de todo el mundo (Ashraf y Ali, 2008). La superficie afectada a nivel mundial es de 8.97 millones de km² (Szabolcs, 1994) y en México un 10 % del área irrigada está afectada por salinidad, y de esta, aproximadamente el 64% se localiza en la parte norte del país (Umali, 1993). La mayoría de las regiones áridas y semiáridas del mundo tiene suelo salino y fuentes de agua con alto contenido de sales, que impiden el crecimiento y desarrollo de cultivos tradicionales (Ungar, 1996). El problema se agudiza en estas regiones donde el suelo presenta drenaje deficiente y alta evaporación (Ruiz *et al.*, 2007).

En la búsqueda de alternativas para mejorar la productividad en estas regiones marginales, se enfatiza la necesidad de identificar y caracterizar nuevos recursos fitogenéticos tolerantes al estrés salino, en particular especies del género *Atriplex* por su adecuado contenido de proteínas y elementos minerales (Soto, 1997; Uchiyama, 1987). El género *Atriplex*, cuenta con alrededor de 250 especies, tanto nativas como introducidas. En Norteamérica sobresale la costilla de vaca o chamizo, la cual sirve todo el año como complemento alimenticio para el ganado (Ortega, 1993). Esta se desarrolla en llanos, laderas de cerros y valles. Las plantas adultas tienen la capacidad de soportar la temperatura extrema de los desiertos, por lo que rara vez presentan daños por heladas o insolación, son resistentes a la sequía (Conabio y Conafor, 1999) y a la alta salinidad (Molina, 1992). De acuerdo a (Sadder T *et al.*, 2013) tanto *Spinacea oleracea* y *Atriplex* son especies relacionadas que pertenecen a la familia *Amaranthaceae*, y que ambas responden a las adiciones de sal. El gen L23551 que codifica la proteína HSC70 del retículo endoplasmático luminal (que representa el espacio encerrado por la membrana del retículo endoplasmático) en *S. oleracea* por su familiaridad y resistencia al estrés salino, se pretenderá por medio de técnicas moleculares el aislamiento, clonación y expresión del gen.

Objetivos

Realizar el aislamiento, clonación y expresión del gen L23551 en la especie *Atriplex canescens*.

Hipótesis

Hi: Se logro aislar, clonar y expresar del gen L23551 en la especie *Atriplex canescens*.

Ho: No se logro aislar, clonar y expresar del gen L23551 en la especie *Atriplex canescens*.

Revisión de Literatura

2.1 Expresión génica en eucariontes.

La regulación de la expresión génica es uno de los eventos más importantes en el control del desarrollo y las respuestas a cambios ambientales. Las proteínas maestras en la regulación de la expresión génica son conocidas como factores de transcripción (Tiessen, 2009).

2.1.1 Niveles de control de expresión génica en los eucariontes.

En forma esquemática, la expresión génica puede regularse en cuatro niveles distintos. El primero y el más importante es el control de la iniciación de la transcripción. El siguiente nivel, el procesamiento del transcrito a un mRNA maduro, puede regularse en el nivel del RNA transcrito primario. Generalmente puede obtenerse diferentes formas de mRNA a partir de un mismo gen mediante corte y empalme alternativo. Después el control de la traducción mediante la edición del mRNA. Finalmente, en el nivel de las proteínas las modificaciones postraduccionales pueden determinar la actividad de una de ellas (Passarge, 2007).

2.1.2 Factores de transcripción

Son proteínas que se unen al DNA para controlar los genes. Estas proteínas regulatorias, estimulan o reprimen la tasa transcripcional de sus genes blanco al unirse a regiones promotoras específicas. La comparación entre especies y la identificación de módulos regulatorios relacionados con los factores de transcripción permitirán diseñar plantas con mayor producción de biomasa o mas tolerantes a diversos factores adversos del medio como la sequia, o incluso manipular ruta de biosíntesis de metabolitos (Tiessen, 2009).

2.1.3 El promotor y otras secuencias que influyen en la transcripción eucariota

De acuerdo a Devlin, 2004; los promotores de los genes eucaróticos transcritos por la RNA polimerasa II se definen operacionalmente como aquellas secuencias que influyen en la iniciación de la transcripción génica. La característica mas sobresaliente de los promotores eucaróticos es la utilización de múltiples sitios de unión de factores de transcripción para regular la actividad génica. En general, estos sitios de unión se encuentran relativamente cerca de la caja TATA que marca el sitio de formación del complejo de preiniciación. En los promotores eucaróticos, a menudo se encuentran otras secuencias consenso, tales como la caja CAAT y GC (la caja GC se refiere a la secuencia consenso GGGCGG). La posición exacta de la caja CAAT y la orientación y numero de cajas GC varían con el promotor. Estas secuencias (como la caja TATA) están presentes en la mayoría, pero no en todos los promotores. La caja CAAT sirve de sitio de unión de diferentes factores de transcripción, incluido NF1. Las múltiples cajas GC suministran múltiples sitios de unión para el factor de transcripción SP1. La presencia de una caja CAAT se considera como indicador de un promotor fuerte, y la caja GC es característica de muchos genes constitutivos.

2.2 Señales provocadas por el estrés salino a nivel celular y molecular

El estrés salino afecta no solo la homeostasis celular sino también la homeostasis iónica en las células vegetales. Los excesos de iones Na^+ y Cl^- pueden provocar cambios conformacionales en las proteínas estructurales y/o cambios en el potencial eléctrico de la membrana citoplasmática; mientras que el estrés osmótico provoca la pérdida de la turgencia y cambios en el volumen celular. Los cambios en la turgencia inducidos por el estrés osmótico y el exceso de iones Na^+ y Cl^- pueden actuar como señales de estrés salino (Fuentes *et al.*, 2009).

Los sensores candidatos para el estrés iónico incluye transportadores y canales iónicos y proteínas de afinidad por iones sobre la membrana plasmática o en el medio intracelular (Zhu, 2002). Bajo concentraciones elevadas de iones Na^+ , este catión puede entrar a la célula por canales iónicos no específicos, lo cual puede provocar despolarización de la membrana citoplasmática, y esto podría significar también una señal de estrés, como es sabido, por activación de canales de calcio (Sanders *et al.*, 1999).

La pérdida de turgencia por otra parte provoca cambios en volumen y retracción de la membrana citoplasmática de la pared celular, de esta forma los receptores de quinasa unidos a membrana, canales y transportadores iónicos, proteínas transmembranas que están en contacto con la pared celular y proteínas semejantes a la integrina, pueden experimentar cambios conformacionales o un agrupamiento, pudiendo de esta manera actuar también como sensores del estrés osmótico (Fuentes *et al.*, 2006).

La salinidad induce la acumulación y biosíntesis de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) (Jia *et al.*, 2002) y también induce la acumulación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Hernández *et al.*, 2001). Evidencias actuales sugieren que las señales primarias de estrés (estrés iónico y osmótico) son transducidas a través de canales de Ca^{2+} así como vías por medio de receptores de quinasa; mientras que las señales secundarias de estrés, tales como ABA, etileno, el H_2O_2 , así como otros mensajeros secundarios intracelulares como fosfolípidos, también regulan la tolerancia de las plantas al estrés salino. Algunas de estas señales pueden no estar confinadas a sitios de estrés primario como las raíces y el movimiento de las mismas hacia otras partes de la planta contribuye a la coordinación de las respuestas en toda la planta en condiciones estresantes (Fuentes *et al.*, 2006).

2.3 Efecto del estrés salino sobre los procesos biológicos naturales de las plantas: Germinación y crecimiento

Las cantidades excesivas de sal en el suelo afectan de manera adversa el crecimiento y desarrollo de las plantas. Procesos biológicos como la germinación de la semilla y su vigor, crecimiento vegetativo, floración y desarrollo del fruto son afectados por las alta concentración de sales (Fuentes *et al.*, 2006).

Resultado del estrés osmótico, las plantas pueden responder con un amplio rango de respuestas fisiológicas a nivel molecular, celular y de organismo (Hasegawa *et al.*, 2000). Estas incluyen, por ejemplo, cambios en el desarrollo y morfología de las plantas (inhibición del crecimiento apical, incremento en el crecimiento de las raíces y cambios en el ciclo de vida), ajuste en el transporte iónico (concentración, expulsión y secuestro de iones) y cambios metabólicos (metabolismo del carbono y la síntesis de solutos compatibles) (Fuentes *et al.*, 2006).

Sin embargo, no todas las plantas responden de manera similar frente al estrés salino, y lo que está relacionado con los distintos rangos de tolerancia que presentan los organismos vegetales a la salinidad. En este sentido las plantas han sido clasificadas como glicofíticas o halofíticas de acuerdo a su capacidad para crecer en un medio con elevada concentración de sales. Las plantas halofitas pueden tolerar rangos salinos elevados, sin embargo la mayoría de las plantas son glicofíticas y no pueden tolerar el estrés salino (Fuentes *et al.*, 2006).

2.5 Mecanismos moleculares de las plantas para combatir el estrés salino

La capacidad para tolerar una elevada salinidad es uno de los principales ejemplos de adaptación genética en plantas. Aunque la vida surgió en el mar, las células vegetales evolucionaron en un medio pobre en Na^+ . Por lo cual, la mayoría de las plantas terrestres han perdido la capacidad para tolerar una salinidad elevada. El problema puede ser planteado a nivel celular, haciendo hincapié en el motivo por el cual las células de las raíces de plantas terrestres no son capaces de excluir Na^+ y concentrar K^+ de forma tan eficaz a como lo hacen las células de animales o de hongos (Yeo, 1998; Benito y Rodríguez-Navarro, 2003). El incremento de Na^+ en el citoplasma provoca a nivel celular la disminución de la síntesis proteica, daños osmóticos relacionados con la pérdida de agua en las células, inhibición del transporte de nutrientes y como consecuencia la muerte celular. En la planta completa se observa la pérdida de hojas o la inhibición del crecimiento de las raíces (Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003).

No obstante, las plantas han desarrollado mecanismos que les confieren tolerancia a elevadas concentraciones externas de Na^+ . Estos mecanismos se manifiestan en un amplio rango de adaptaciones, que comprenden desde el nivel celular hasta el de planta completa (Yeo, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000; Tester y Davenport, 2003). A nivel celular, se minimiza la entrada de Na^+ , con objeto de mantener una elevada relación K^+/Na^+ en el citoplasma (Amtmann y Sanders, 1999; Maathuis y Sanders, 1999; Serrano y Rodríguez-Navarro, 2000); así mismo, se potencia la extrusión de Na^+ desde el citoplasma, hacia el exterior celular o hacia el lumen de la vacuola, a través de antiportadores Na^+/H^+ de tipo SOS1 o NHX1, respectivamente (Serrano y Rodríguez-Navarro, 2000; Zhu, 2001; Zhu, 2003; Ward *et al.*, 2003). A nivel de planta completa, las plantas tolerantes a ambientes salinos suelen minimizar el transporte de Na^+ al xilema (especialmente las glicófitas; Hasegawa *et al.*, 2000) o maximizar, una vez alcanzado el tallo, la recircularización, a través del floema, hacia zonas especializadas de la planta donde se produce la acumulación de Na^+ , como ocurre en hojas maduras o células secretoras (Tester y Davenport, 2003).

Procedimiento Experimental

El experimento se llevara acabo en el municipio de Torreón, Coahuila ubicado en las coordenadas $103^\circ 26' 33''$ longitud oeste y $25^\circ 32' 40''$ latitud norte, a una altura de 1,120 metros sobre el nivel del mar, en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna localizada en Periférico Raúl López Sánchez s/n Col. Valle Verde C.P 27054 en el laboratorio de agroecología en las fechas de Enero 2014 - Junio 2015:

La siembra se realizara en 10 macetas de plástico, forrado con hojas de polietileno y llenada cada una con arena y con vermicompost en proporción 1:1 en invernadero. Las adiciones de sal se efectuaran 20 días después de la siembra en cuatro niveles de concentración y por duplicado; S0: Blanco, S1:25mmM L^{-1} , S2:50mmM L^{-1} , S3:75mmM L^{-1} y S4:100mmM L^{-1} de NaCl , Na_2SO_4 y CaCl_2 respectivamente, con una adición por muestra de un litro de solución. La rutina de irrigación se hará de acuerdo al Manual de manejo del cultivo *Atriplex canescens* del Instituto Nacional de Ecología. Se utilizaran plantas de 25 días de maduración de las cuales se tomara una muestra de hoja y raíz. Los tejidos de la raíz y hoja serán posteriormente empleados para el aislamiento del DNA con el uso del Mini Kit DNeasy para planta de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para el estudio de la expresión del gen L23551 fueron obtenidos los siguientes cebadores diseñados manualmente por el programa *Primer3* para la RT-PCR y clonación del cDNA:

Primer Izquierdo	GACGCCAACGGTATCCTAAA
Primer Derecho	AACAGCCTCGACTTCCTTGA

Para la extracción de RNA se utilizara el Mini Kit RNeasy para planta de acuerdo con los pasos del proveedor. Un microgramo de ARN será transcrito inversamente usando los primers específicos y con el Kit RT-PCR con el paso Qiagen. Las condiciones de PCR serán estandarizados con el uso de primers específicos para la tubulina. La expresión génica se evaluara indirectamente con el colorante SYBR verde para la maquina RT-PCR. La amplificación lineal semicuantitativa por RT-PCR será obtenida tras 27 ciclos. Las reacciones se llevara a cabo en el equipo de PCR bajo las siguientes condiciones: El paso inicial para la activación de la PCR será de 15 minutos a 95°C, la transcripción reversa será de un 1 ciclo de 30 minutos a 50°C, la desnaturalización será de un minuto a 94°C, el anillamiento será de un minuto a 58°C del gen L23551 y a 60°C la tubulina. Para la extensión será de un minuto a 72°C y para la extensión final serán 10 minutos a 72°C. Los productos de la extensión serán separados por electroforesis con gel de agarosa al 1.2% a 120V en un buffer TBE. Las reacciones de la RT-PCR serán repetidas varias veces para estandarizar el tiempo y la temperatura del anillamiento. Las fotografías del gel de electroforesis serán elegidas en base a la mejor de 3 repeticiones de PCR. Los geles se teñirán con bromuro de etilio y se visualizara por el sistema de documentación UV Progel.

Se purificara el cDNA del gen con el Sistema Plasmido Miniprep PureYield con los pasos de Promega, para clonarse dentro del vector pTz57R/T de *Escherichia coli* (DH5α), los plásmidos de colonias infectadas se usaran para su análisis de restricción con el uso de las enzimas XbaI y Sall, que flanquean los sitios de clonación, esto para confirmar la presencia del inserto clonado. Las células de *E.coli* que contengan los plásmidos recombinantes deseados serán entregadas a un laboratorio, para la secuenciación del inserto de cDNA clonado. Posteriormente el gen secuenciado se expresara con el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* del kit de expresión pESC vectores con los pasos de Cultek.

Cronograma de actividades.

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Estandarización de técnicas moleculares.	X	X	X	X								
Periodo de siembra.				X	X							
Periodo de recolección de muestras.					X	X						
Análisis de muestras.							X	X	X	X		
Elaboración del marco teórico.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis de resultados.											X	X

5.-Productos esperados

Se entregara la cepa de *E.coli* (DH5α) con el gen clonado, una tesis de posgrado para obtener el grado de Maestría en Ciencias Agrarias con la publicación de dos artículos y una presentación en algún congreso nacional.

6.-Literatura citada

1. Amtmann A., Sanders D. (1999). Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. *Advances in Botanical Research* 29: 75-112
2. Ashraf M, Ali Q (2008). Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environ Exp Bot* 63:266-273.
3. Axel Tiessen Favier (2009). Fundamentos y metodologías innovadoras para el mejoramiento genético de maíz. Editorial Fundacion Ciencia Activa. 1:154-155.
4. Benito B., Rodríguez-Navarro A. (2003). Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* 36: 382-389.

5. Conabio y Conafor (1999). Fichas técnicas de especies forestales estratégicas. No. 6. *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. Gaceta de la Red Mexicana de Germoplasma Forestal. 2:67-70.
6. Eberhard Passarge, MD (2007). Genética: Texto y Atlas. Editorial Médica Panamericana S.A. 3:218-219.
7. F.G. Bolívar-Zapata, C. Arias-Ortíz, E. Arriaga-Arellano, H. Barrera-Saldaña, P. Bosch-Guha, J. Espinosa-Fernández, E. Galindo-Fentanes, A. Gálvez-Mariscal, A. Gracia-Gasca, L.R. Herrera-Estrella, A. Larqué-Saavedra, A. López Munguía-Canales, O. Muñoz-Hernández, A. Noyola-Robles, R. Ortega-Lomelín, R. Quintero-Ramírez, T. Ramírez-Reivich, S. Revah-Moiseev, J.A. Serratos-Hernández, J. Soberón-Mainero y X. Soberón-Mainero. (2001). Biotecnología Moderna para el Desarrollo de México en el Siglo XXI; Retos y Oportunidades. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología/Redacta, México, D.F. (6):147-166.
8. Fuentes L, Sosa M, Perez Y. (2006). Aspectos fisiológicos y bioquímicos del estrés salino en plantas. Monografía. Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos".
9. Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.K. & Bohnert H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* (51):463-499.
10. Hernandez JA, Ferrer MA, Jimenez A, Barcelo AR, Sevilla F (2001) Antioxidant systems and O₂/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol* (127):817 – 831.
11. Jia W, Wang Y, Zhang S, Zhang J (2002) Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J Exp Bot* (53):2201-2206.
12. Maathuis FJM., Sanders D. 1999. Plasma membrane transport in context – making sense out of complexity. *Current Opinion in Plant Biology* (2):236-243.
13. Monther T. Sadder, Firoz Anwar, Abdullah A. Al.Doss (2013). Gene expression and physiological analysis of *Atriplex halimus* (L.) under salt stress. *Australian Journal of Crop Science*. (1): 112-118.
14. Ortega RSA.(1993) Sistemas de captación de agua de escurrimiento para el establecimiento de costilla de vaca *Atriplex canescens* . INIFAP –SARH. Coyoacán, D.F. (Bol 76).
15. Ruiz E, Aldaco A, Montemayor J, Fortis M, Olague J, Villagomez J. (2007). Aprovechamiento y mejoramiento de un suelo salino mediante el cultivo de pastos forrajeros. *Téc Pecu Mex* 2007;45(1):19-24.
16. Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11:691-706.
17. Serrano R., Rodríguez-Navarro A. (2001). Ion homeostasis during salt stress in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 399-404.
18. Soto, G. (1997). *Atriplex nummularia* Una especie pionera contra la desertificación. *Corporacion Nacional Forestal*. Cordoves 281. La Serena, Chile.
19. Szabolcs I. Prospects of soil salinity for the 21 st century. 15th World Congress of soil Sci Soc 1994 (1):123-141.
20. Tester M., Davenport R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.
21. Thomas M. Devlin (2004). Textbook of Biochemistry with clinical correlations, Fifth edition Editorial Reverte, 5:352-353.
22. Uchiyama, Y. (1987). Salt tolerance of *Atriplex nummularia*. *Technical Buletin of the Tropical Agricultural Research Center*, 22: 1-69.
23. Umali DL.(1993) Irrigation induced salinity technical. World Bank. Washington, D.C Paper No. 215 1993:3-25.
24. Ungar, I, (1996). Effect of salinity on seed germination, growth, and ion accumulation of *Atriplex patula* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, 83:604-607.
25. Ward JM., Hirschi KD., Sze H. (2003). Plants pass the salt. *TRENDS in Plant Science* 8: 200-201.
26. Yeo A. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany* 49: 915-929.

27. Zhu J-K (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53:247-273.
28. Zhu J-K (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sciences* 6: 66-71.
29. Zhu J-K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445.